

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

厚生労働科学研究委託費  
難治性疾患等克服研究事業  
(難治性疾患等実用化研究事業(難治性疾患等実用化研究事業))  
委託業務成果報告(分担)

## 新規 BAFF 受容体阻害剤を用いたシェーグレン症候群の革新的治療薬の開発

### 分担業務項目

#### 抗 BAFF 受容体抗体の作製に関する研究

研究分担者 仲 哲治 独立行政法人医薬基盤研究所 創薬基盤研究部 創薬基盤研究部長

#### 研究要旨

シェーグレン症候群は、眼や口等の乾燥症状を主徴とし、患者 QOL が著しく低下する免疫疾患である。シェーグレン症候群にはときに臓器病変を伴うため、他の免疫難病と同様、慎重な経過観察もしくは積極的な治療が必要である。近年、関節リウマチ等の治療法がめざましく進展したが、シェーグレン症候群に対する治療法は未確立のままである。最近の研究により、シェーグレン症候群では、BAFF 受容体 (BAFFR) がその病態に関与することが示唆されている。

本研究では、シェーグレン症候群を対象に BAFFR を標的とする革新的治療薬を創出することを目的とし、その研究の一環として BAFFR 阻害剤もしくは抗 BAFFR 抗体の薬効を検討できるようなシェーグレン症候群の動物モデルの探索を行う。

#### A. 研究目的

シェーグレン症候群は、眼や口等の乾燥症状を主徴とし、患者 QOL が著しく低下する免疫疾患である。シェーグレン症候群には臓器病変を伴う場合もみられ、他の免疫難病と同様に慎重な経過観察もしくは積極的な治療が必要である。近年、関節リウマチ等に対し、免疫関連分子を標的とするさまざまな治療法が開発され、患者の生命予後および QOL が大きく改善している。しかしながら、シェーグレン症候群に対する治療法は未確立のままである。

本研究全体の目的は、シェーグレン症候群を対象に BAFFR を標的とする革新的治療薬を創出することである。候補治療薬の薬効を確認するためには、シェーグレン症候群のモデル動物を用意する

必要があり、本研究ではモデル動物の探索を行う。

#### B. 研究方法

##### (1) マウス

NZB マウスと NZW マウスの交配によって生まれる NZBWF1 雌マウスは、全身性エリテマトーデスに類似の自己免疫疾患を自然発症するため、ループモデルの代表として広く利用されている。一方で NZBWF1 マウスはシェーグレン症候群に類似の病変も自然発症するという報告がある。

また、NOD マウスは I 型糖尿病を自然発症するモデルマウスとして知られているが、シェーグレン症候群類似の病変を生じると報告されている。

今回、上記の候補マウスを入手し、医薬基盤研究所実験動物施設にて維持・観察を行った。

## (2) HE 染色

ホルマリン固定後のマウス組織を、ヘマトキシリン・エオジンにて染色した。

## C. 研究結果

シェーグレン症候群のモデルマウスの顎下腺を採取して、組織学的検索を行った。代表的な図(マウス顎下腺、HE 染色 図 1a、1b)に示すように、唾液腺組織内の導管周囲にリンパ球と思われる単核球の浸潤を認めた。

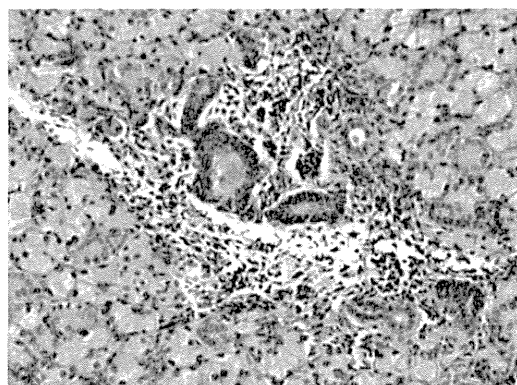


図 1a NZWBF1 マウス顎下腺

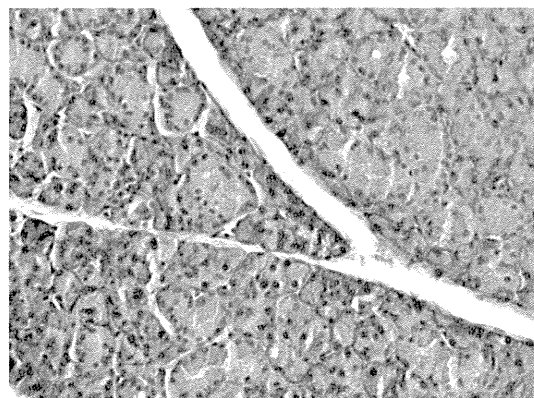


図 1b コントロールマウス(Balb/c)顎下腺組織

## D. 考察

シェーグレン症候群のモデル動物はいくつか報告されているものの、確立したモデルはない。今回使用したマウスでは、シェーグレン症候群に最も特徴的所見である唾液腺炎が組織学的に認められ、以前の報告を支持する結果が得られた。今回

のモデルは、他疾患も合併しており、二次性シェーグレン症候群のモデルと考えられる。原発性シェーグレン症候群に近いモデルが入手可能かどうか、引き続き検索を行う予定である。

## E. 結論

今回使用したマウスは、シェーグレン症候群に類似の唾液腺病変を自然発症しており、候補役の薬効をスクリーニングするモデル動物候補になると考えられた。

## F. 健康危険情報

該当無し

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Furukawa K, Kawamoto K, Eguchi H, Tanemura M, Tomimaru Y, Akita H, Hama N, Wada H, Kobayashi S, Nonaka Y, Takamatsu S, Shinzaki S, Kumada T, Satomura S, Ito T, Serada S, Naka T, Mori M, Doki Y, Miyoshi E, Nagano H. Clinico-Pathological Significance of Leucine-Rich Alpha-2-Glycoprotein-1 in Sera of Patients with Pancreatic Cancer. *Pancreas*. 2015 Jan;44(1):93-98.
2. Yang L, Fujimoto M, Murota H, Serada S, Fujimoto M, Honda H, Yamada K, Suzuki K, Nishikawa A, Hosono Y, Yoneda Y, Takehara K, Imura Y, Mimori T, Takeuchi T, Katayama I, Naka T. Proteomic identification of heterogeneous nuclear RNP-K as a novel cold-associated autoantigen in patients with secondary Raynaud's phenomenon. *Rheumatology*. 2014 In Press
3. Kawabata A, Serada S, Naka T, Mori Y. Human herpesvirus 6 gM/gN complex interacts with v-SNARE in infected cells. *Journal of General Virology* 2014 Dec; 95(Pt 12):2769-77.

4. Azuma K, Serada S, Takamatsu S, Terao N, Takeishi S, Kamada Y, Naka T, Miyoshi E. Identification of sialylated glycoproteins in doxorubicin-treated hepatoma cells with glycoproteomic analyses. *Journal of Proteome Research* 2014 Nov 7;13(11):4869-77.
  5. Morimoto A, Serada S, Enomoto T, Kim A, Matsuzaki S, Yokoyama T, Takahashi T, Ueda Y, Yoshino K, Fujita M, Fujimoto M, Kimura T, Naka T. Annexin A4 induces platinum resistance in a chloride- and calcium-dependent manner. *Oncotarget*. 2014 Sep 15;5(17):7776-87.
  6. Kotobuki Y, Yang L, Serada S, Tanemura A, Yang F, Nomura S, Kudo A, Izuhara K, Murota H, Fujimoto M, Katayama I, Naka T. Periostin Accelerates Human Malignant Melanoma Progression by Modifying the Melanoma Microenvironment. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2014 Jul;27(4):630-9.
  7. Oji Y, Tatsumi N, Fukuda M, Nakatsuka S, Aoyagi S, Hirata E, Nanchi I, Fujiki F, Nakajima H, Yamamoto Y, Shibata S, Nakamura M, Hasegawa K, Takagi S, Fukuda I, Hoshikawa T, Murakami Y, Mori M, Inoue M, Naka T, Tomonaga T, Shimizu Y, Nakagawa M, Hasegawa J, Nezu R, Inohara H, Izumoto S, Nonomura N, Yoshimine T, Okumura M, Morii E, Maeda H, Nishida S, Hosen N, Tsuboi A, Oka Y, Sugiyama H. The translation elongation factor eEF2 is a novel tumor-associated antigen overexpressed in various types of cancers. *Int J Oncol*. 2014 May;44(5):1461-9.
  8. Yang L, Murota H, Serada S, Fujimoto M, Kudo A, Naka T, Katayama I. Histamine Contributes to Tissue Remodeling via Periostin Expression. *J Invest Dermatol*. 2014 Aug;134(8):2105-13.
  9. Annexin A4-conferred platinum resistance is mediated by the copper transporter ATP7A Matsuzaki S, Enomoto T, Serada S, Yoshino K, Nagamori S, Morimoto A, Yokoyama T, Kim A, Kimura T, Ueda Y, Fujita M, Fujimoto M, Kanai Y, Kimura T, Naka T. *Int J Cancer*. 2014 Apr 15;134(8):1796-809.
  10. Sadaoka T, Serada S, Kato J, Hayashi M, Gomi Y, Naka T, Yamanishi K, Mori Y. Varicella-zoster virus ORF49 functions in the efficient production of progeny virus through its interaction with essential tegument protein ORF44. *Journal of Virology*. 2014 Jan;88(1):188-201.
  11. Ota M, Serada S, Naka T, Mori Y. MHC class I molecules are incorporated into human herpesvirus-6 viral particles and released into the extracellular environment *Microbiol Immunol*. 2014 Feb;58(2):119-25.
- ## 2. 学会発表
1. 2014 年 ACR/ARHP Annual Meeting: November 14 -19 Boston, Massachusetts, Boston Convention & Exhibition Center  
Leucine-Rich Alpha-2 Glycoprotein Is a Potential Disease Activity Marker Under IL-6 Suppression in Autoimmune Arthritis  
Yusuke Takahashi, Minoru Fujimoto, Satoshi Serada and Tetsuji Naka
  2. 2014 年 ICIS 26th - 29th October 2014 Melbourne Convention and Exhibition Centre, Melbourne  
Leucine-rich  $\alpha 2$  glycoprotein promotes TGF $\beta$ 1-induced apoptosis in the lewis lung carcinoma cell lines  
Norihiko Takemoto, Tomoshige Matsumoto, Satoshi Serada, Minoru Fujimoto, Tetsuji Naka
  3. 2014 年 EULAR2014, June 14, Paris  
MEASUREMENT OF SERUM LEUCINE-RICH ALPHA-2 GLYCOPROTEIN, A NOVEL

DISEASE ACTIVITY BIOMARKER IN  
RHEUMATOID ARTHRITIS, FOR THE  
DETECTION OF BIOLOGIC-ASSOCIATED  
TUBERCULOSIS

Tomoharu Ohkawara, Minoru Fujimoto, Satoshi  
Serada, Tetsuji Naka

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得

該当無し

2. 実用新案登録

該当無し

3. その他

該当無し

厚生労働科学研究委託費  
難治性疾患等克服研究事業  
(難治性疾患等実用化研究事業(難治性疾患等実用化研究事業))  
委託業務成果報告(分担)

新規 BAFF 受容体阻害剤を用いたシェーグレン症候群の革新的治療薬の開発

分担業務項目

抗 BAFF 受容体抗体の作製に関する研究

研究分担者 角田慎一 独立行政法人医薬基盤研究所バイオ創薬プロジェクト プロジェクトリーダー  
研究協力者 鎌田春彦 独立行政法人医薬基盤研究所バイオ創薬プロジェクト サブプロジェクトリーダー  
研究協力者 長野一也 独立行政法人医薬基盤研究所バイオ創薬プロジェクト プロジェクト研究員

研究要旨

シェーグレン症候群は、多彩な炎症症状を伴う自己免疫疾患の一種であり、わが国の患者数は約 30 万人である。主な症状は涙液や唾液の減少であり、これが患者の QOL を著しく害しているが、現在のところ、根治薬は開発されていない。炎症の原因の一つは活性化 B 細胞による自己抗体の異常産生であることが知られていることから、その抑制薬が開発できれば、シェーグレン症候群の根治につながる可能性がある。研究代表者である竹内らの先行研究により、シェーグレン症候群患者の末梢血単核球で BAFF 受容体が異常に高発現していること、そのことが B 細胞での抗体の過剰産生に関与することが明らかとなっていることから、BAFF 受容体がシェーグレン症候群に対する創薬標的として有望と考えられる。そこで本研究では、シェーグレン症候群の画期的治療薬の開発を目的として、BAFF 受容体阻害薬の開発を試みる。阻害薬の開発にあたって、低分子化合物の探索と最適化を試みる一方、BAFF 受容体に対するモノクローナル抗体を作製し、抗体医薬の候補として、あるいは機能解析ツールとしての応用を図る。上記観点から、当該分担課題においては、本年度、BAFF 受容体に対するモノクローナル抗体の作製を試みるとともに、候補抗体のスクリーニング系に関する検討を実施した。

A. 研究目的

シェーグレン症候群は、多彩な炎症症状を伴う自己免疫疾患の一種であり、わが国の患者数は約 30 万人である。主な症状は涙液や唾液の減少であり、これが患者の QOL を著しく害しているが、現在のところ、根治薬は開発されていない。炎症の原因の一つは活性化 B 細胞による自己抗体の異常産生であることが知られていることから、その抑制薬が開発できれば、シェーグレン症候群の根

治につながる可能性がある。これまでに研究代表者である竹内らは、シェーグレン症候群患者の末梢血単核球で BAFF 受容体が異常に高発現していること、そのことが B 細胞での抗体の過剰産生に関与することが明らかとしている (Arth Res & Ther 2011)。すなわち、BAFF 受容体がシェーグレン症候群に対する創薬標的として有望であることを示唆している。そこで本研究では、シェーグレン症候群の画期的治療薬の開発を目的として、

BAFF 受容体阻害薬としての低分子化合物の開発を試みる。先行研究により、BAFF 受容体阻害作用を示す化合物を同定しており、当該化合物の最適化を試みる。一方で、BAFF 受容体に対するモノクローナル抗体を作製し、抗体医薬の候補として、あるいは機能解析ツールとしての応用を図る。

上記観点から、本分担課題においては、BAFF 受容体に対するモノクローナル抗体の作製を担当する。平成 26 年度はハイブリドーマの作製を行い、また、抗体のスクリーニング系に関する検討も実施した。

## B. 研究方法

### 動物への免疫

Balb/c マウスに対し、ヒト BAFF 受容体 (BAFF-R) 遺伝子発現ベクターを尾根部皮内および腹腔に接種し、DNA 免疫を行った。さらに、追加免疫として BAFF-R 細胞外ドメイン Fc キメラタンパク質を腹腔投与した。経日的に採血し、BAFF-R に対する抗体価を下記スクリーニング系により確認した。

### ハイブリドーマの作製

抗体価の上昇が確認できたマウスから脾細胞を回収し、マウスミエローマ細胞 P3U1 と融合させることでハイブリドーマを作製した。培養上清の BAFF-R 結合性を下記スクリーニング系で評価し、候補のハイブリドーマクローンを選別した。

### スクリーニング系

抗 BAFF-R 抗体のスクリーニング系の一つとして、BAFF-R を一過性に発現させた 293T 細胞に対する結合性をフローサイトメトリーで解析する方法を用いた。

なお抗 BAFF 受容体抗体の作製は永田諭博士および阿部康弘博士 (Sanford Research) の協力も得て実施した。

(倫理面への配慮)

本研究では実験動物であるマウスを用いた。動物実験は、「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」に準じ、所属機関の動物実験倫理委員会の承認を得たうえで実施した。

## C. 研究結果

D 項にまとめて記載した。

## D. 考察

最初に、ヒト BAFF-R に対する抗体をマウスハイブリドーマ法により作製することを試みた。BAFF-R 発現ベクターを 2 週に一回、計 8 回皮内および腹腔に接種し、さらにブーストのため BAFF-R-Fc タンパク質を腹腔に接種した。血清抗体価を BAFF-R 強制発現細胞のフローサイトメトリー解析で確認し、抗体価の上昇が認められたマウスから脾細胞を回収し、ハイブリドーマを調製した。モノクローン化して培養上清を用いてスクリーニングを行った結果、4 つの抗 BAFF-R 抗体産生候補クローンを取得することができた。今後、抗体を精製し、より詳細な特性解析を試みる予定である。

一方、抗 BAFF-R 抗体の一次スクリーニング系として、ヒト BAFF-R 全長 cDNA を 293T 細胞に一過性発現させた細胞を用いたフローサイトメトリーを構築した。本系により、細胞に発現する BAFF-R に結合する抗体クローンを選別できることが判明した。今後は BAFF-R からのシグナルを解析できるスクリーニング系を構築する予定である。

## E. 結論

本年度、当分担課題においては、ヒト BAFF-R に対するモノクローナル抗体作製を試み、複数の候補クローンを取得した。また、抗 BAFF-R 抗体の親和性によるスクリーニング系を構築した。引

き続き、抗体の特性解析等を実施する予定である。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Inoue M, Kamada H, Abe Y, Higashisaka K, Nagano K, Mukai Y, Yoshioka Y, Tsutsumi Y, Tsunoda S.: Aminopeptidase P3 (APP3), a novel member of the TNF/TNFR2 signaling complex, induces phosphorylation of JNK. J. Cell Sci. in press.
2. Kamada H, Taki S, Nagano K., Inoue M, Ando D, Mukai Y, Higashisaka K, Yoshioka Y, Tsutsumi Y, Tsunoda S.: Generation and characterization of a bispecific Diabody targeting EPH receptor A10 and CD3. Biochem. Biophys. Res. Commun, 456:908-912, 2015.
3. Nagano K, Yamashita T, Inoue M, Higashisaka K, Yoshioka Y, Abe Y, Mukai Y, Kamada H, Tsutsumi Y, Tsunoda S. : Eph receptor A10 has a potential as a target for a prostate cancer therapy, Biochem. Biophys. Res. Commun. 450(1):545-9, 2014.
4. Nagano K, Maeda Y, Kanasaki S, Watanabe T, Yamashita T, Inoue M, Higashisaka K, Yoshioka Y, Abe Y, Mukai Y, Kamada H, Tsutsumi Y, Tsunoda S.: Ephrin receptor A10 is a promising drug target potentially useful for breast cancers including triple negative breast cancers, J. Controlled Release. 189:72-9, 2014.
- 向 洋平, 堤 康央, 角田慎一: 炎症性腸疾患モデルマウスに対する TNFR1 指向性アンタゴニストの治療効果., 第 30 回日本 DDS 学会., 東京, 2014 年 7 月.
2. 鎌田春彦, 井上雅己, 阿部康弘, 長野一也, 向 洋平, 東阪和馬, 吉岡靖雄, 堤 康央, 角田慎一: TNFR2 のシグナル伝達解明に向けたヒト TNFR2 指向性変異体の創製とその応用., 第 87 回日本生化学会大会., 京都, 2014 年 10 月.
3. 森 宣瑛, 向 洋平, 東阪和馬, 吉岡靖雄, 長野一也, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央: 短期間での抗体取得に向けた最適な免疫方法の探索., 第 87 回日本生化学会大会., 京都, 2014 年 10 月.
4. 三里一貴, 向 洋平, 東阪和馬, 吉岡靖雄, 長野一也, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央: 独自に構築した非免疫ヒト型ファージ抗体ライブラリの品質評価., 日本薬学会第 135 年会., 神戸, 2015 年 3 月.
5. 森 宣瑛, 向 洋平, 東阪和馬, 吉岡靖雄, 長野一也, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央: 短期間での高親和性抗体取得に向けた最適な免疫方法の探索., 日本薬学会第 135 年会., 神戸, 2015 年 3 月.

### 2. 学会発表

1. 安藤大介, 鎌田春彦, 井上雅己, 長野一也,

## H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

### 1. 特許取得

該当なし

### 2. 実用新案登録

該当なし

### 3. その他

該当なし



厚生労働科学研究委託費  
難治性疾患等克服研究事業  
(難治性疾患等実用化研究事業(難治性疾患等実用化研究事業))  
委託業務成果報告(分担)

新規 BAFF 受容体阻害剤を用いたシェーグレン症候群の革新的治療薬の開発

分担業務項目

ハイスループットスクリーニング法および医薬品リポジショニングを用いた  
BAFF 受容体阻害剤の探索と最適化

研究分担者 鈴木勝也(慶應義塾大学 医学部 リウマチ内科 講師)  
吉本桂子(慶應義塾大学 医学部 リウマチ内科 特任研究員)  
研究協力者 菅原邦夫(田辺三菱製薬株式会社 薬理第一研究所 主任研究員)

研究要旨:本研究は厚生労働省の定める指定難病であり、未だ治療法が確立されていないシェーグレン症候群(Sjögren's syndrome: SS)を対象とし、SSの病態に深く関与するBAFF(B cell stimulating factor of TNF family)受容体を標的とする革新的治療薬を創出することを目的とする。当該分担課題は本研究代表者竹内らが独自に開発したハイスループットスクリーニング(HTS)法によって見出したリード化合物であるピロロピリミジン誘導体化合物のBAFF受容体機能阻害作用の確認と最適化およびドラッグリポジショニングによる既承認医薬品よりBAFF受容体阻害剤を探索することを本年度の目的としている。SSの病態にはB細胞による過剰な抗体産生、多種の自己抗体産生が関与しており、SS患者末梢血単球でのBAFF受容体の発現亢進が患者末梢血B細胞からの過剰な抗体産生に影響を与えていることを竹内らは世界で初めて明らかにした。これらの結果からBAFF受容体はSS治療にむけた格好の標的であると考えられ、化合物ライブラリーを用いたHTS法によりBAFF受容体へのBAFF結合を阻害するピロロピリミジン化合物を取得した(特許第5628647号)。これらの化合物はSS患者末梢血B細胞と単球の共培養で得られた抗体産生を容量依存的に阻害し(PCT/JP2014/076820)、マウス脾臓リンパ球からのin vitro抗体産生も強力に抑制したことから極めて有望な治療薬の候補と考えられ、これらをリード化合物として製薬企業(田辺三菱製薬株式会社)と共同で最適化を開始した。一方で、in vitroでのBAFF受容体機能評価系を用いて既承認薬ライブラリーのリポジショニングを開始した。これまで210医薬品を検定し、そのうち約10%に有意なBAFF受容体機能阻害活性を見出した。

## A. 研究目的

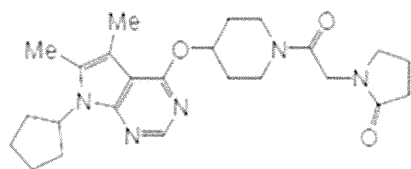
本研究は、免疫難病である SS に対し、慶應義塾大学医学部・薬学部、慶應義塾大学病院（早期・探索的臨床試験拠点）と医薬基盤研究所および田辺三菱製薬が連携して、BAFF 受容体を新規標的分子とした革新的治療薬を開発することを目的とする。

## B. 研究方法

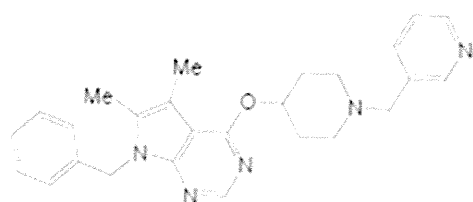
1) ハイスループットスクリーニング (HTS) 法によって得られた化合物 A および B (図 1) の in vitro での BAFF 受容体機能阻害作用の検証

図 1 化合物の構造

化合物 A



化合物 B



(1) マウス脾臓由来 B 細胞を用いた検証  
C56BL/6N マウス脾臓より naïve B 細胞を単離し、抗マウス IgM 抗体、CpG、マウス IL-4 およびマウス BAFF による刺激培養に化合物を 3 $\mu$ M から 100 $\mu$ M の濃度で添加し IgG 産生に及ぼす化合物の影響を検証した。

(2) ヒト単球由来細胞株 THP-1 を用いた検証

THP-1 (human acute monocytic leukemia) にヒト IFN $\gamma$  刺激を加えた後、ヒト BAFF を添加することにより IL-6 産生を亢進する BAFF 受容体機能評価を目的とした培養系を用いて、化合物の BAFF により誘導される IL-6 産生に対する影響を検証した。

(3) ヒト末梢血単球を用いた検証

健康人末梢血より単球を単離し、ヒト BAFF 存在下で培養し IL-6 産生促進を認める BAFF 受容体機能評価系に 1~30 $\mu$ M の濃度で化合物を添加し、IL-6 産生に対する化合物の影響を検証した。

(4) ヒト末梢血 B 細胞を用いた検証

健康人末梢血より B 細胞を単離し、抗ヒト IgM 抗体、CD40ligand、ヒト IL-4、ヒト BAFF を添加培養し、IgG 産生を誘導する B 細胞機能評価系に 1~30 $\mu$ M の濃度で化合物を添加し、IgG 産生に対する化合物の影響を検証した。

(5) ヒト末梢血単球と B 細胞の共培養による検証

健康人および SS 患者末梢血より B 細胞と単球を単離し、ヒト BAFF 存在下で共培養し、IgG 産生を誘導する単球および B 細胞の機能評価系に 1~30 $\mu$ M の濃度で化合物を添加し、IgG 産生に対する化合物の影響を検証した。

2) ハイスループットスクリーニング (HTS) 法によって得られた化合物の in vivo での IgG 産生抑制作用の検討

MRL/lpr マウス、メス 8 週令に化合物を 1mg/kg~0.2mg/kg の投与量で 3 回/週投与し、生存率、体重、血中抗 ds-DNA 抗体価を測定し、炎症モデルにおける化合物の影響を検討した。

### 3) ハイスループットスクリーニング (HTS) 法によって得られた化合物の最適化に向けた準備

研究協力者である田辺三菱製薬の薬理第一研究所にて MRL/lpr マウスに化合物を 1mg/kg 腹腔内投与し、血中における化合物の濃度を経緯的に測定する薬物動態試験を立案した。

### 4) 医薬品リポジショニング

本研究の分担研究者である慶應義塾大学薬学部分析化学教室水島教授より 840 種類の既存医薬品が提供された。研究方法 1)-(2) に示した THP-1 を用いた BAFF 受容体機能評価系を用いて、これらの既存医薬品 210 種類につき BAFF により誘導される IL-6 産生に対する影響を検討した。

(倫理面への配慮)

1) 薬効薬理試験に使用した SS 患者の血液検体は慶應義塾大学病院において SS の外来患者からインフォームドコンセントを得たうえで採取した。患者の臨床情報も当該患者からインフォームドコンセントを得たうえで利用する。血液検体の採取および臨床情報の利用については、慶應義塾大学医学部の倫理委員会の審査を受け、すでに承認を得ている。

2) 動物実験は「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」、「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」を遵守して実施する。

## C. 研究結果

BAFF 受容体阻害剤化合物 A および B について特許査定を受けた (特許第 5628647

号)。

### 1) ハイスループットスクリーニング (HTS) 法によって得られた化合物の in vitro での BAFF 受容体機能阻害作用の検証

(1) C56BL/6N マウス脾臓 naïve B 細胞を抗マウス IgM 抗体、CpG、マウス IL-4 およびマウス BAFF により刺激培養することで IgG および IgM 産生の著しい亢進が認められた。これに対して化合物 A および B を 3 $\mu$ M から 100 $\mu$ M の濃度で添加し IgG および IgM 産生に及ぼす化合物の影響を検討したところ、化合物 A、B とも 3 $\mu$ M で IgG 産生、IgM 産生ともそれぞれ 70%、60% 阻害を示した。

(2) ヒト単球由来細胞株 THP-1 を用いた検証

IFN $\gamma$  刺激された THP-1 からの BAFF による IL-6 産生誘導を化合物 A、B とも 6 $\mu$ M で約 50% 阻害することが検証された。

(3) ヒト末梢血単球を用いた検証

健康人末梢血単球からの BAFF により IL-6 が産生される BAFF 受容体機能評価系に化合物 A および B を添加し、IL-6 産生に対する影響を検討した。その結果化合物 A、B とも 6 $\mu$ M で約 50% の IL-6 産生阻害を示すことが確認された。

(4) ヒト末梢血 B 細胞を用いた検証

健康人末梢血 B 細胞を抗ヒト IgM 抗体、CD40ligand、ヒト IL-4、ヒト BAFF で刺激培養することにより IgG 産生亢進を認める培養系に化合物 A および B を添加し、IgG 産生に対する影響を検討した。その結果、化合物 A、B とも 7.5 $\mu$ M で BAFF による IgG 産生亢進をほぼ 100% 抑制した。

(5) ヒト末梢血単球と B 細胞の共培養による検証

ヒト末梢血 B 細胞と単球をヒト BAFF 存在下で共培養すると、IgG 産生の著しい亢進を認める。この培養系に化合物 A および B を添加し、BAF による IgG 産生促進作用に対する影響を検討した。その結果、7.5 $\mu$ M での化合物 A および B の IgG 産生阻害はそれぞれ約 40%、100%であり、化合物 B の IgG 産生に対する影響は極めて高いことが示された (図 2)。

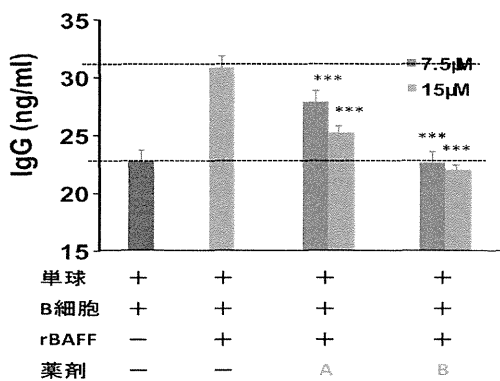


図 2 末梢血単球と B 細胞の共培養による IgG 産生に対する化合物の効果

### 2) ハイスループットスクリーニング (HTS) 法によって得られた化合物の in vivo での IgG 産生抑制作用の検証

MRL/lpr マウス、メス 8 週令に化合物 A および B を 1mg/kg $\sim$ 0.2mg/kg の投与量で 3 回/週投与し、32 週間観察し、生存率、血中抗 ds-DNA 抗体価を測定した。その結果、化合物 A、B とも 0.2mg/kg 投与群において生理食塩水投与群と比較して有意に高い生存率 (図 3) と抗 dsDNA 抗体価の低下 (図 4) を認めた。これらに基づき PCT 出願を行い、田辺三菱製薬へ知財の導出を行った (PCT/JL2014/076820)。

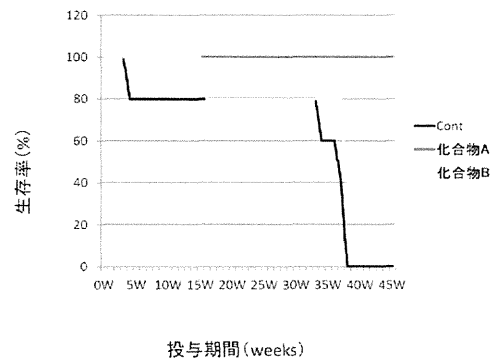


図 3 化合物投与 MRL/lpr マウス生存率

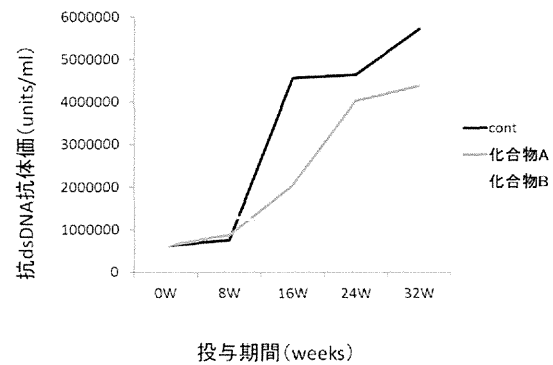


図 4 化合物投与 MRL/lpr マウスの血中抗 dsDNA 抗体価

### 3) ハイスループットスクリーニング (HTS) 法によって得られた化合物の最適化に向けた準備

MRL/lpr マウスに化合物を 1mg/kg 腹腔内投与し、投与後 8 時間までの血中における化合物の濃度を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて経時的に測定する試験を立案し、田辺三尾製薬薬理第一研究所にて薬物動態試験を開始した。

### 4) 医薬品リポジショニング

本研究の分担研究者である慶應義塾大学薬学部分析化学教室水島教授より提供された 840 種類の既存医薬品のうち 210 種類の医薬品について BAFF 受容体機能阻害作用を検定した。具体的には THP-1 を用いた BAFF 受容体機能評価系 (方法 1-(2)で記載) を用いて BAFF による IL-

6 産生促進機能の阻害作用を指標に医薬品 20 $\mu$ M、2 $\mu$ M の濃度における BAFF 受容体機能阻害作用の検定を行った。評価基準は下記の通りである。

- ① 20 $\mu$ M で IL-6 産生を 50%以上抑制すること
- ② 20 $\mu$ M と 2 $\mu$ M で濃度依存的な阻害活性が認められること

その結果、21 種の既存医薬品が評価基準を満たすことが明らかとなった (図 5)。

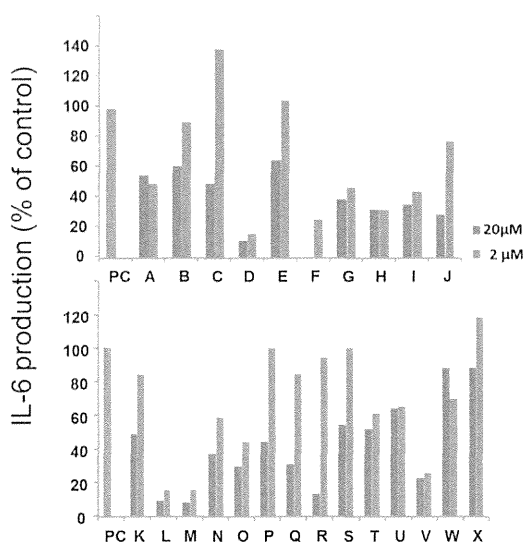


図 5 医薬品リポジショニングによる既存医薬品の THP-1 からの BAFF による IL-6 産生抑制作用

#### D. 考察

SS は自己免疫疾患の一種で、わが国の患者数は約 30 万人とされ、厚生労働省の定める指定難病の一つである。主な症状は涙液や唾液の減少であり、これが患者の QOL を著しく害するが、根治薬は存在しない。発症原因の一つは活性化 B 細胞による自己抗体の異常産生であり、その抑制が SS の根治につながりうる。研究代表者らは BAFF 受容体を治療標的とする新

規治療法および治療薬開発の有用性を見出し、HTS 法を用いて BAFF 受容体阻害剤の候補化合物を取得した。今年度の研究成果より候補化合物 A および B はヒト末梢血単球からの BAFF による IL-6 産生亢進を有意に抑制し、ヒト末梢血 B 細胞と単球の共培養に BAFF 刺激を加えた際に誘導される IgG の過剰産生を用量依存的に阻害することが明らかとなった。さらにマウス脾臓 B 細胞を用いた *in vitro* 抗体産生も強力に抑制することが明らかとなった。さらに、これらの化合物を全身性の炎症モデルである MRL/lpr マウスに投与したところ、顕著に高い生存率と血中抗 dsDNA 抗体価の低下を認めた。これらの結果から、化合物 A および B は SS 治療薬の有力候補と考えられる。今後はこれらの化合物をリード化合物として、BAFF 受容体阻害剤の最適化を行う。そのため薬物動態試験の準備を開始し、最適化へとつなげていく。

また、既承認薬のリポジショニングとして THP-1 を用いた BAFF 受容体機能評価系で検定を行ったところ、210 種類の医薬品の約 10% に BAFF 受容体機能阻害作用が認められた。今後はリポジショニングを続行するとともに、BAFF 受容体阻害活性が認められた薬剤について、ヒト末梢血細胞を用いた機能評価系で詳細な検討を進めていく。既承認薬は承認された用法・用量の範囲で安全性が担保されていること等から、速やかな SS 治療薬の開発が可能になることが有利な点であり、SS 治療薬の創出が加速されると期待できる。

## E. 結論

HTS 法により見出した化合物 A および B はマウス脾臓 B 細胞およびヒト末梢血単球、B 細胞を用いて構築した in vitro BAFF 受容体機能評価系にて阻害作用を有し、マウス in vivo 試験においても高い生存率と血中抗 dsDNA 抗体低下を示した。これらの結果から化合物 A および B は SS 治療薬の有力候補と考えられ、今後これらをリード化合物として BAFF 受容体阻害剤の開発を進めていく。また既存医薬品リポジショニングで BAFF 受容体阻害作用が認められた医薬品については今後 in vitro、in vivo 両面から詳細な検討を進めていく。

## F. 健康危険情報

該当せず

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Yoshimoto K, Kurasawa T, Suzuki K, Takeuchi T. Involvement of  $\alpha$ E $\beta$ 7 (CD103) in the pathogenesis of autoimmune diseases. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi*. 37(3):171-5, 2014.
- 2) Nishina N, Kikuchi J, Hashizume M, Yoshimoto K, Kameda H, and Takeuchi T. Baseline levels of soluble interleukin-6 receptor predict clinical remission in patients with rheumatoid arthritis treated with tocilizumab: implications for molecular targeted therapy. *Ann Rheum Dis*, 73:945-7, 2014.

### 2. 学会発表

- 1) Yoshimoto K, Ishioka E, Nihsikawa A, Suzuki K, Kameda H, Abe T, Takeuchi T. BAFF activates monocytes to produce IL-6 through BAFF receptor(BR3) for IgG production from peripheral B cells in patients with primary Sjogren's syndrome. *Mod. Rheumatol*. S167, 第 58 回日本リウマチ学会総会学術集会 2014.
- 2) Yoshimoto K, Ishioka E, Nihsikawa A, Suzuki K, Kameda H, Abe T, Takeuchi T. BAFF-induced IL-6 signaling plays a pivotal role in interactions between monocytes and B cells that accelerate IgG Overproduction in patients with primary Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 73(suppl2), EULAR 2014, 2014.
- 3) Yoshimoto K, Ishioka E, Suzuki K, Itou T, Sugano T, Yamada H, Okuda A, Ishiwata H, Doi T, Hirokawa T and Takeuchi T. Pyrrolopyrimidine Derivatives That Inhibit Binding of BAFF to Its Receptor, BR3, Are Drug Candidates for Primary Sjögren's Syndrome. *Arthritis Rheum* 66(10), ACR Annual Meeting 2014, 2014.
- 4) Yoshimoto K, Ishioka E, Nishikawa A, Suzuki K, Kameda H, Abe T,

Takeuchi T. BAFF induces IL-6 production by monocytes through a BAFF receptor and promotes IgG production by B cells in patients with primary Sjögren's syndrome. *J Immunol.* 192:115.7, Immunology 2014, 2014.

剤 PCT/JP2014/076820

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

5) Ishioka E, Yoshimoto K. Nihsikawa A, Suzuki K. Kameda H, Takeuchi T. Abnormality of the activated peripheral B cells of patients with primary Sjogren's syndrome. *Mod. Rheumatol.* S3518, 第 58 回日本リウマチ学会総会学術集会 2014.

6) Nihsikawa A, Yoshimoto K. Ishioka E, Suzuki K. Kameda H, Takeuchi T. Regulatory mechanism of BAFF receptor expression on human peripheral monocytes. *Mod. Rheumatol.* S351, 第 58 回日本リウマチ学会総会学術集会 2014

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

##### 1-1. 特許取得

1) ピロロピリミジン誘導体を有効成分とする BAFF の結合阻害剤

特許第 5628647 号：用途

2) 抗ヒト BAFF 抗体

特許第 5570681 号：物質

##### 1-2. 特許出願

1) 炎症性疾患の予防及び／又は治療



### Ⅲ. 学会等発表実績



## 学 会 等 発 表 実 績

委託業務題目：新規 BAFF 受容体阻害剤を用いたシェーグレン症候群の革新的治療薬の開発  
 慶應義塾大学 医学部・薬学部 竹内 勤、水島 徹、鈴木 勝也、吉本 桂子  
 独立行政法人 医薬基盤研究所 仲 哲治、角田 慎一

### 1. 学会等における発表

発表した成果	発表者氏名	学会等名	発表した時期	国内・外の別
ドラッグリポジショニング 招待講演	水島 徹	JST-ERATO 河岡感染宿主 応答ネットワークプロジェ クトシンポジウム	2014	国内
ドラッグリポジショニングの 現状と課題 基調講演	水島 徹	千里ライフサイエンス 専門実務セミナー・新規効 能治療薬の創製「ドラッ グ・リポジショニングを用 いて」	2014	国内
ドラッグリポジショニングの 現状と課題 招待講演	水島 徹	日本薬学会	2014	国内
Identification of a unique NSAID, fluoro- loxicoprofen with gastroprotective activity. 招待講演	Tohru Mizushima	4th International Forum in Annual Meeting of the Japanese Society of Gastroenterology	2014	国内
Therapeutic effect of lecithinized superoxide dismutase (PC-SOD) on idiopathic pulmonary fibrosis in humans and bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice.	Tohru Mizushima	The International Advanced Drug Delivery Symposium	2014	国外
Drug repositioning 招待講演	Tohru Mizushima	Japan Bioforum	2014	国外
ドラッグリポジショニングー 既承認薬を用いた新薬開発 招待講演	水島 徹	東京大学薬学部講演会	2014	国内
ドラッグリポジショニング 招待講演	水島 徹	医療薬学フォーラム 2014	2014	国内
ラッグリポジショニングによる 創薬パラダイムシフト 会長講演	水島 徹	日本 DDS 学会	2014	国内

Protection by expression of heat shock protein 70 against repeated social defeat stress-induced depression-like phenotypes in mice.	Tohru Mizushima	University of Singapore	2014	国外
BAFF activates monocytes to produce IL-6 through BAFF receptor (BR3) for IgG production from peripheral B cells in patients with primary Sjogren's syndrome.	Yoshimoto K, Ishioka E, Nihsikawa A, Suzuki K, Kameda H, Abe T, Takeuchi T.	第 58 回日本リウマチ学会 総会学術集会	2014	国内
BAFF-induced IL-6 signaling plays a pivotal role in interactions between monocytes and B cells that accelerate IgG Overproduction in patients with primary Sjogren's syndrome.	Yoshimoto K, Ishioka E, Nihsikawa A, Suzuki K, Kameda H, Abe T, Takeuchi T.	EULAR 2014	2014	国外
Pyrrolopyrimidine Derivatives That Inhibit Binding of BAFF to Its Receptor, BR3, Are Drug Candidates for Primary Sjogren's Syndrome.	Yoshimoto K, Ishioka E, Suzuki K, Ito T, Sugano T, Yamada H, Okuda A, Ishiwata H, Doi T, Hirokawa T and Takeuchi T.	ACR/ARHP Annual Meeting	2014	国外
BAFF induces IL-6 production by monocytes through a BAFF receptor and promotes IgG production by B cells in patients with primary Sjogren's syndrome.	Yoshimoto K, Ishioka E, Nishikawa A, Suzuki K, Kameda H, Abe T, Takeuchi T.	Immunology 2014	2014	国外
Abnormality of the activated peripheral B cells of patients with primary Sjogren's syndrome.	Ishioka E, Yoshimoto K, Nihsikawa A, Suzuki K, Kameda H, Takeuchi T.	第 58 回日本リウマチ学会 総会学術集会	2014	国内
Regulatory mechanism of BAFF receptor expression on human peripheral monocytes.	Nihsikawa A, Yoshimoto K, Ishioka E, Suzuki K, Kameda H, Takeuchi T.	第 58 回日本リウマチ学会 総会学術集会	2014	国内
Leucine-Rich Alpha-2 Glycoprotein Is a Potential Disease Activity Marker Under IL-6 Suppression in Autoimmune Arthritis	Yusuke Takahashi, Minoru Fujimoto, Satoshi Serada and Tetsuji Naka	ACR/ARHP Annual Meeting	2014	国外
Leucine-rich $\alpha$ 2 glycoprotein promotes TGF $\beta$ 1-induced apoptosis in the Lewis lung carcinoma cell lines	Norihiko Takemoto, Tomoshige Matsumoto, Satoshi Serada, Minoru Fujimoto, Tetsuji Naka	ICIS	2014	国外

MEASUREMENT OF SERUM LEUCINE-RICH ALPHA-2 GLYCOPROTEIN, A NOVEL DISEASE ACTIVITY BIOMARKER IN RHEUMATOID ARTHRITIS, FOR THE DETECTION OF BIOLOGIC-ASSOCIATED TUBERCULOSIS	Tomoharu Ohkawara, Minoru Fujimoto, Satoshi Serada, Tetsuji Naka	EULAR2014	2014	国外
炎症性腸疾患モデルマウスに対する TNFR1 指向性アンタゴニストの治療効果	安藤大介, 鎌田春彦, 井上雅己, 長野一也, 向 洋平, 堤 康央, 角田慎一	第 30 回日本 DDS 学会	2014	国内
TNFR2 のシグナル伝達解明に向けたヒト TNFR2 指向性変異体の創製とその応用	鎌田春彦, 井上雅己, 阿部康弘, 長野一也, 向 洋平, 東阪和馬, 吉岡靖雄, 堤 康央, 角田慎一	第 87 回日本生化学会大会	2014	国内
短期間での抗体取得に向けた最適な免疫方法の探索.	森 宣瑛, 向 洋平, 東阪和馬, 吉岡靖雄, 長野一也, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央	第 87 回日本生化学会大会	2014	国内
独自に構築した非免疫ヒト型ファージ抗体ライブラリの品質評価	三里一貴, 向 洋平, 東阪和馬, 吉岡靖雄, 長野一也, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央	日本薬学会第 135 年会	2014	国内
短期間での高親和性抗体取得に向けた最適な免疫方法の探索	森 宣瑛, 向 洋平, 東阪和馬, 吉岡靖雄, 長野一也, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央	日本薬学会第 135 年会	2014	国内

2. 学会誌・雑誌等における論文掲載

(竹内 勤)

[雑誌]

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Takeuchi T, Matsubara T, Ohta S, Mukai M, Amano K, Tohma S, Tanaka Y, Yamanaka H, Miyasaka N.	Biologic-free remission of established rheumatoid arthritis after discontinuation of abatacept: a prospective multi-center, observational study in Japan.	Rheumatology	online Sep. 24		2014
Kaneko Y, Koike T, Oda H, Yamamoto K, Miyasaka N, Harigai M, Yamanaka H, Ishiguro N, Tanaka Y, Takeuchi T.	Obstacles to the implementation of the treat-to-target strategy for rheumatoid arthritis in clinical practice in Japan.	Mod Rheum	online June 20		2014
Akiyama M, Kaneko Y, Hanaoka H, Kuwana M, <u>Takeuchi T.</u>	Polychondritis presenting with oculomotor and abducens nerve palsies as initial manifestation.	Mod Rheum	online June 2		2014
Iwahashi M, Inoue H, Matsubara T, Tanaka T, Amano K, Kanamoto T, Nakano T, Uchimura S, Izumihara T, Yamazaki A, Karyekar C, Takeuchi T.	Efficacy, safety, pharmacokinetics and immunogenicity of abatacept administered subcutaneously or intravenously in Japanese patients with rheumatoid arthritis and inadequate response to methotrexate: a phase II/III, randomized study.	Mod Rheum	online April 7		2014
Izumi K, Kaneko Y, Yasuoka H, Seta N, Kameda H, Kuwana M, Takeuchi T.	Tocilizumab is clinically, functionally and radiographically effective and safe either with or without low-dose methotrexate in active rheumatoid arthritis patients with inadequate responses to DMARDs and/or TNF inhibitors. A single center retrospective cohort study (KEIO-TCZ study) at 52 week.	Mod Rheum	online April 1		2014
Kaneko Y, Kuwana M, Kondo H, Takeuchi T.	Discordance in global assessments between patient and estimator in patients with newly diagnosed rheumatoid arthritis: associations with progressive joint destruction and functional impairment.	J Rheumatology	40	1061-66	2014
Kaneko Y, Hanaoka H, Hirakata M, Takeuchi T, Kuwana M.	Distinct arthropathies of the hands in patients with anti-aminoacyl tRNA synthetase antibodies: usefulness of autoantibody profiles in classifying patients.	Rheumatology	53	1120-24	2014